



A Study of Responses of Osteoblasts to Vibrational Stimulation

著者	太田 岳
号	44
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	歯博第732号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00097011

氏 名（本籍）： おお 太 田 たける 岳

学 位 の 種 類： 博 士 （ 歯 学 ） 学 位 記 番 号： 歯 博 第 7 3 2 号

学位授与年月日： 平成 28 年 3 月 25 日 学位授与の要件： 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科・専攻： 東北大学大学院歯学研究科（博士課程）歯科学専攻

学位論文題目： A Study of Responses of Osteoblasts to Vibrational Stimulation
（骨芽細胞の振動刺激応答に関する研究）

論文審査委員：（主査）教授 五十嵐 薫
教授 若 森 実 講師 千 葉 美 麗

論文内容要旨

【目的】力学的振動刺激が治療に有効であることが整形外科、歯科領域で報告されている。本研究は、*in vitro* 振動刺激負荷装置を開発し、振動刺激パラメータが骨芽細胞の分化に与える影響と、骨芽細胞の振動刺激応答メカニズムについて検討した。

【方法】周波数および加速度を制御する *in vitro* 振動負荷装置を開発し、タイプ I コラーゲンでコーティングしたシリコーン膜製の細胞培養ウェル中心に、底面から加速度と周波数を変化させて正弦波振動を負荷した。トリプルロゼットもしくはシングルエレメントストレインゲージを用いて培養表面に生じたひずみを動ひずみ計にて測定した。骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞に振動刺激を負荷し、リアルタイム PCR 法による骨形成マーカー遺伝子発現と、細胞生存率を解析した。また、F-アクチン、ビンキュリン、核の染色を行い、蛍光および共焦点顕微鏡にて観察した。さらに、ERK1/2（Extracellular signal-regulated kinase 1/2）のリン酸化をウェスタンブロッティング法にて解析した。

【結果】（1）振動により培養表面全体に発生したひずみは正弦波形信号として検出され、部位により逆位相を示した。最大主ひずみの方向は培養用ウェルの中心を通る線上に検出された。

（2）最大ひずみは、最大加速度に対して線形に増加した。

（3）周波数 60 Hz、加速度 5.0 m/s^2 、10 min/day の振動条件下で 1 日後の骨芽細胞においては、Runx2、Osterix、Type I collagen、Alkaline phosphatase（ALP）遺伝子発現がコントロール群に対して有意に上昇したが、加速度が 1.0 m/s^2 の条件下では有意な差は認められなかった。一方、周波数 30 Hz、加速度 5.0 m/s^2 、10 min/day の振動条件下では、Runx2、Osterix、ALP 遺伝子発現の有意な上昇が認められた。また、各条件下で細胞生存率に有意な差は認められなかった。

（4）周波数 60 Hz、加速度 5.0 m/s^2 、30 min/day の振動刺激下で 1 日後の骨芽細胞においては、Osteocalcin 遺伝子発現はコントロール群に対して差は認められなかったが、2、3 日後では有意に上昇

した。

(5) 振動刺激により、骨芽細胞のアクチンストレスファイバー形成は増強し、不規則な配向性を示した。

(6) 振動刺激負荷 15 分後から一過性の ERK1/2 リン酸化が起こり、そのリン酸化は MEK1/2 (Mitogen-activated protein kinase kinase 1/2) 阻害剤により抑制された。

【結論】 *in vitro* 振動刺激負荷装置を開発し、細胞培養表面上のひずみ様相を明らかにした。また、振動刺激が、アクチンストレスファイバーの増強および ERK1/2 のリン酸化を伴う骨芽細胞分化を促進することが示唆された。

審査結果要旨

力学的振動刺激は、海綿骨密度を増加し、歯科矯正学的歯の移動を促進することから、骨粗鬆症治療や歯科矯正治療の新たな戦略として注目されている。しかしながら、振動刺激が骨や歯周組織を構成する細胞に感受され、その後の反応を惹起するメカニズムについては不明な点が多い。このような背景から、本研究では *in vitro* 振動刺激負荷装置を開発し、骨芽細胞分化に及ぼす振動刺激パラメータの影響とそのシグナル伝達系を明らかにすることを目的としており、臨床応用のための基礎的研究として重要な研究テーマである。

本研究では、*in vitro* 振動刺激負荷装置を開発し、ストレインゲージ法により培養用ウェル表面に生じたひずみを動ひずみ計によって測定し、作製した実験系を厳密に評価している。また、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞に振動刺激を負荷し、骨形成マーカー遺伝子の発現、細胞生存率、F-アクチン・ビンキュリン・核の形態学的観察、シグナル伝達分子のリン酸化を解析している。このように、研究目的に即した妥当な実験計画が立てられており、信頼性は高いと判断する。

本研究の結果、以下のことが示された。すなわち、①振動により培養用ウェル表面に発生したひずみは正弦波形信号として検出され、部位により逆位相を示した。最大主ひずみの方向は培養用ウェルの中心を通る線上に検出された。②適切な周波数と加速度を用いた振動条件下では、Runx2 などの骨形成マーカー遺伝子発現が有意に上昇し、骨芽細胞分化を促進する可能性が示唆された。また、用いた条件下で細胞生存率に有意な差は認められなかった。③振動刺激により、骨芽細胞のアクチンストレスファイバー形成は増強し、不規則な配向性を示した。④振動刺激負荷 15 分後から一過性の ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2) のリン酸化が引き起こされた。

本研究で特記すべきは、振動刺激による培養用ウェル表面上の動的ひずみ様相が明らかな *in vitro* 振動刺激装置を新たに開発した点である。この開発により、適切な周波数と加速度を用いた振動条件下では、細胞培養面に生じているひずみが微小であるにもかかわらず、骨芽細胞のアクチンストレスファイバーが増強し、刺激 15 分で一過性の ERK1/2 活性化が誘導され、骨芽細胞分化が促進される可能性が明らかとなった。これらの知見は、骨芽細胞の分化促進効果を示す振動刺激パラメータとしてのひずみ、周波数、加速度、作用時間に関わる極めて有用な情報であり、振動刺激の臨床応用に多大な貢献を果たすものと考えられる。

以上のことから、本論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと判断する。